

病態肺におけるサーファクタントの変動に関する研究 第2報 気道内silica投与により惹起される慢性肺傷害

— 肺胞蛋白症類似モデル —

渡 辺 智 之 黒 木 由 夫

札幌医科大学医学部生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

本 田 泰 人

札幌医科大学医学部内科学第3講座 (主任 阿部庄作教授)

Studies on Changes in Pulmonary Surfactant in Pathological States of the Lung.

2. Chronic Lung Injury Induced by Intratracheal

Silica-treatment: PAP Like Model

Tomoyuki WATANABE and Yoshio KUROKI

First Department of Biochemistry, Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief : Prof. T. AKINO)

Yasuhito HONDA

Third Department of Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief : Prof. S. ABE)

ABSTRACT The levels of surfactant protein (SP)-A, SP-B and SP-D were studied in bronchoalveolar lavage (BAL)-subfractions and lamellar body (LB) subfractions of rats with chronic lung injury induced by intratracheal exposure of silica (40 mg/kg of body weight) to rats. Silica- or saline-treated rats were sacrificed on day 7, day 14 and day 28, and BAL and LB were obtained. The BAL was divided into two subfractions by two different methods, i.e., alv1 and alv2 fractions as defined by Nicholas *et al.*, and LA (large aggregates) and SA (small aggregates) fractions according to Jobe *et al.* The LB was divided into two subfractions, lbA and lbB fractions according to Nicholas *et al.* These BAL-subfractions and LB subfractions were analyzed for total protein, total phospholipid and surfactant proteins such as SP-A, SP-B and SP-D. The results obtained are summarised as follows:

1) The levels of total protein and phospholipid in alv2 and SA fractions increased in silica-treated rats through day 14, indicating that pool sizes of small aggregate-formed surfactant (SA-Sf), which represented nearly the totality of the phospholipid content, had increased in the alveolar

Abbreviations:

PAP: pulmonary alveolar proteinosis

Sf : surfactant

LB : lamellar body

TM : tubular myelin

LA : large aggregate

SA : small aggregate

PC : phosphatidylcholine

PG : phosphatidylglycerol

PI : phosphatidylinositol

SP : surfactant protein

BAL : bronchoalveolar lavage

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

SDS-PAGE: sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

space, but until day 28, they remained unchanged in the alveolar space in the chronic lung injury. This result suggests that at first conversion of large aggregate-formed surfactant (LA-Sf) to SA-Sf might have been induced in the alveoli, but finally the LA-Sf accumulation rate might exceed the rate of conversion of LA-Sf to SA-Sf in the chronic lung injury.

2) In silica-treated rats, SP-A and SP-B levels in LA-Sf and lbB subfractions increased markedly during the experimental period, indicating that Sf is synthesized markedly by alveolar type II cells and accumulates in the alveolar space of silica-treated rats.

3) Changes of SP-A, SP-B and SP-D levels in BAL-subfractions of silica-treated rats varied from each other. SP-A increased markedly in LA fraction, while the increase of SP-B in LA fraction was relatively small. This result suggests that SP-B is also degraded in the alveolar space during the chronic lung injury. SP-D increased markedly in SA fraction of silica-treated rats.

(Received September 9, 1994 and accepted October 11, 1994)

Key words: Silica, Surfactant protein A, Surfactant protein B, Surfactant protein D, Chronic lung injury.

1 緒 言

silica 粒子の気道内投与後、肺胞腔にサーファクタント (Sf)・リン脂質が大量に蓄積することが示されている^{1,2)}。この Sf・リン脂質の蓄積は Sf の肺胞からの除去機構の障害に起因する可能性が示唆されてきた³⁾。肺胞内蓄積リン脂質の分析から、正常とは質的に異なるリン脂質、すなわち、ホスファチジルグリセロール(PG)とホスファチジルイノシトール (PI) の比が正常肺胞リン脂質に比べて著しく低下していることが指摘された³⁾。silica 投与ラットで、PG/PI 比の低下がみられたことから、この動物モデルでは肺胞表面の傷害に引き続き、肺胞 II 型細胞の増殖、分化が進行していることが示唆されている。肺胞腔内への大量のリン脂質の蓄積とリン脂質組成の質的变化という silica 投与動物の特徴は、肺胞蛋白症(PAP)患者から採取した BAL 液の特徴とよく一致する⁴⁾ので、silica 投与ラットは PAP 動物モデルとして用いられている。

前報⁵⁾で著者らは、ARDS 動物モデルの急性肺傷害における Sf の変動を検討し、Sf 蛋白質の変動が、Sf 全体の変化の鍵であることを示唆した。本研究では肺病態の異なる silica 前処理ラットによる慢性肺傷害における Sf の変動、特に Sf 蛋白質の変動について検討した。教室の足立ら^{6,7)}は、silica 処理ラットにおける Sf リン脂質及び蛋白質の変動を検討し、この動物モデルの特徴について詳細に考察しているが、本研究では肺胞腔における Sf の変化を格子様構造に富む large aggregate (LA) 型 Sf と小ベジクル構造の small aggregate (SA) 型 Sf に分画、またラメラ封入体画分を lbA, lbB

に分画して、Sf 蛋白質 SP-A, SP-B, SP-D の silica 処置による変化を追跡することにより新知見を得たので報告する。

2 実験方法

2・1 気管内 silica 投与による慢性肺傷害ラットの作製

気管内 silica 投与による慢性肺傷害ラットの作製は Dethloff *et al.*²⁾の方法に従って行った。一晩絶食した Sprague-Dawley 種雄ラット(体重 200-250 g)に生食 100 μ l 中 silica 40 mg/kg を気管内投与した silica 処

2・2 肺洗浄液及びラメラ封入体画分分離

前報⁵⁾に記した方法で行った。ラットをペントバルビタール Na 麻酔後に腹部大動脈切断により脱血屠殺し、気管内にベニューラ V 1 (Top 社)を挿入した。肺動脈に 0.25 M ショ糖液を注入して肺を充分灌流後、肺を摘出し生理食塩水 10 ml で 5 回洗浄、BAL 液を得た。この BAL 液を 150 \times g 5 分間遠心して細胞成分を除去後、上清を更に Nicholas *et al.*⁸⁾の方法に従って 1,000 \times g 25 分間遠心し、沈査と上清に分離、この沈査を alv 1 画分、上清を alv 2 画分とした。また、別の分離方法として、細胞成分除去後の上清を Jobe *et al.*⁹⁾の方法に従って 40,000 \times g 15 分間遠心し、沈査と上清に分離、この沈査を LA 画分、上清を SA 画分とした。Nicholas *et al.*⁸⁾、Duck-Chong¹⁰⁾の方法を一部改変した方法で、ラット肺組織から LB 画分を分離した。BAL 液採取のための肺洗浄後の肺組織を 0.25 M ショ糖液中で細切後、1.0 M ショ糖液でホモジナイズし、1,000 \times g 5 分間遠心、その上清を 1.0 M ショ糖液濃

度に調整した。これに 0.8 M, 0.7 M, 0.6 M, 0.5 M, 0.4 M, 0.3 M, 0.2 M のショ糖液を重ねし, 80,000×g 2 時間遠心した。0.4 M, 0.5 M ショ糖液画分を採取し LB 画分とした。LB 画分分離には, この LB 画分を等量の水で希釈後 8,000×g 30 分遠心, この沈査を lbA 画分, 更に上清を 100,000×g 1 時間超遠心した沈査を lbB 画分とした。

2.3 SP-A, SP-B 及び SP-D の定量

SP-A, SP-B の定量は, Shimizu *et al.*¹¹⁾の方法にて, 各々, サンドイッチ ELISA 法, コンペティティブ

ELISA 法により行った。SP-D の定量は, Ogasawara *et al.*¹²⁾ による サンドイッチ ELISA 法にて行った。肺ホモジネートおよび BAL 液の LA 画分の連続希釈による標準曲線は, SP-A, SP-B, SP-D によるそれぞれの標準曲線とよく一致した。

2.4 その他の分析法

蛋白質の定量は, BSA (Sigma 社) を標準とし, Lowry *et al.*¹³⁾ の方法で行った。BAL 亜画分の蛋白質は, Laemmli¹⁴⁾ の方法による sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) 電気泳動及び Swank and Munkres¹⁵⁾ の方法による 8 M 尿素 SDS-PAGE により分析した。総リン脂質の定量は, Bligh and Dyer¹⁶⁾ 法で脂質抽出後, Bartlett¹⁷⁾ の方法で行った。

3 成 績

3.1 BAL 亜画分の総蛋白質量及びリン脂質量の変化

BAL 亜画分蛋白質の約 80-90% は, SA 型 Sf 画分 (alv 2, SA 画分) にあり, silica 粒子 (40 mg/kg 体重) の気道内投与によって, 14 日目以降に LA, SA 画分の蛋白質量は著明に増加 (Fig. 1), 28 日目では対照群の約 2-3.5 倍であった (Table 1)。28 日目の alv 1, alv 2 画分蛋白質量の増加は, それぞれ LA, SA 画分とほぼ同じであった。BAL 亜画分のリン脂質量も silica 投与後 14 日目以降に著明に増加, 特に alv 1 画分が約 13.7 倍, LA 画分が約 6.7 倍に増加した。また, リン脂質量の LA/SA 比は, silica 投与及び対照でほぼ同じであっ

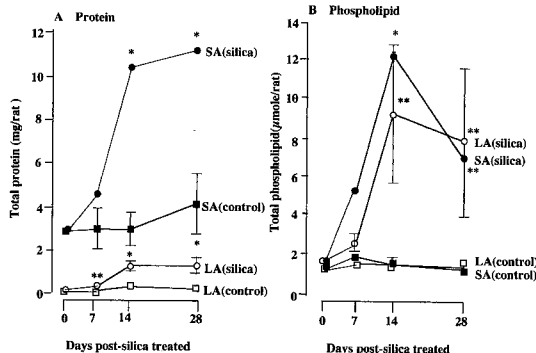


Fig. 1 Changes in protein (A) and phospholipid (B) contents in BAL-subfractions, i. e., large aggregates (LA) and small aggregates (SA), of rat lung after saline or silica treatment. Results are expressed as means±S.D. of 3 animal studies.
* $p<0.01$; ** $p<0.05$ when compared with the levels of control.

Table 1 Protein and phospholipid contents of BAL-subfractions and lamellar body subfractions of rat lung at 28 days in response to silica (experiment using 40 mg/kg of body wt.).

| | Protein (μ g/rat) | | | Phospholipid (μ mole/rat) | | | Phospholipid/protein | |
|----------------------------|------------------------|--------------------|-------|--------------------------------|--------------------|-------|----------------------|----------------------|
| | Control (A) | Silica-treated (B) | B/A | Control (a) | Silica-treated (b) | b/a | Control (a/A) | Silica-treated (b/B) |
| BAL-subfractions | | | | | | | | |
| alv 1 | 220.6±18.5 | 955.0±270.0* | 4.33 | 0.293±0.085 | 4.025±2.484 | 13.74 | 1.33 | 4.21 |
| alv 2 | 4792.6±831.3 | 11586.0±1862.5* | 2.42 | 2.626±0.337 | 8.839±1.430* | 3.37 | 0.55 | 0.76 |
| LA | 426.6±81.4 | 1500.3±375.6* | 3.52 | 1.154±0.009 | 7.732±3.790** | 6.70 | 2.71 | 5.15 |
| SA | 5894.0±1129.3 | 11307.0±1493.3* | 1.92 | 1.270±0.217 | 6.906±0.891* | 5.44 | 0.22 | 0.61 |
| Lamellar body subfractions | | | | | | | | |
| Ib A | 122.0±6.1 | 221.0±41.5** | 1.81 | 0.815±0.134 | 2.393±0.967** | 2.94 | 6.68 | 10.83 |
| Ib B | 78.0±7.5 | 1263.6±241.8* | 16.20 | 0.666±0.178 | 24.020±6.122* | 36.07 | 8.54 | 19.01 |

alv 1 and alv 2, and Ib A and IbB were separated from bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue of rats, respectively, according to Nicholas *et al.*⁸⁾

LA (large aggregates) and SA (small aggregates) were separated from bronchoalveolar lavage fluid of rats according to Jobe *et al.*⁹⁾

Values are means ± S.D. for different preparations (n=3)

* $p<0.01$, ** $p<0.05$ when compared with the levels in controls

たが, silica 投与群の alv 1/alv 2 比は, 対照の約 4 倍であり, silica 投与後 28 日目の肺胞腔では, 極く低速で遠心される Sf リン脂質の凝集があると思われた。これを反映して SA 型 Sf 画分 (alv 2, SA 画分) のリン脂質/蛋白質比の変化は認められなかった。LA 型 Sf 画分 (alv 1, LA 画分) の同比は, 約 2-3 倍に上昇していた。

Sf リン脂質の主成分ホスファチジルコリン (PC) 量の silica 投与による経時変化を Fig. 2 に示す。silica 投与後 14 日目で SA, LA 両画分の PC 量は著明に増量し, その SA/LA 比は 7 日目でピークで, それ以降は下降した。つまり silica 投与動物では LA 型 Sf から SA 型 Sf への著明な変換はないと考えられた。

3・2 BAL 亜画分の Sf 蛋白質量の変化

LA 画分の SP-A 及び SP-B 量は, silica 投与後 7 日目で約 2 倍に増加した。その後両 Sf 蛋白質ともに 28 日目まで著明に増加し, 28 日目で SP-A は約 20 倍, SP-B は約 3 倍となった。alv 1 画分の変化はより大きく, 28 日目で SP-A は約 26 倍, SP-B は約 7 倍に増加した (Table 2, Fig. 3)。silica 投与により, SA 画分の SP-A は, LA 画分の SP-A の変化より著明ではないが, 明らかに増加した。しかし, SA 画分 SP-B 量は, silica 投与による大きな変化はなかった。すなわち, silica 投与に対する肺胞内 SP-A と SP-B の挙動は明らかに異なることが認められた。SP-D の大部分は SA 型 Sf 画分 (alv 2, SA 画分) に存在し, silica 投与によって約 14 倍に増量した。なお, silica 処理による BAL 液亜画分の SP-A, SP-B 及び SP-D は, 電気泳動上著明な分解は認められなかった (データは示していない)。

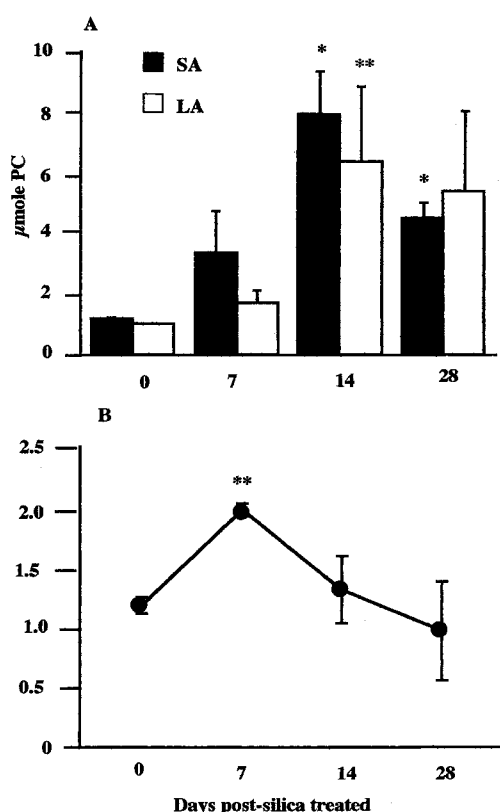


Fig. 2 A: Alveolar phosphatidylcholine (PC) pool sizes of large (LA) (open bars) and small aggregates (SA) (solid bars) of surfactant in rats with silica-induced lung injury from day 0 to day 28 after silica treatment.

B: The ratio of small to large aggregates of alveolar saturated PC pool sizes

* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ * when compared with the levels of control.

Table 2 SP-A, SP-B and SP-D contents of BAL-subfractions and lamellar body subfractions of rat lung at 28 days in response to silica (experiment using 40 mg/kg of body wt.).

| | SP-A (μg/rat) | | | SP-B (μg/rat) | | | SP-D (μg/rat) | | |
|-----------------------------------|---------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|------|---------------|--------------------|-------|
| | Control (A) | Silica-treated (B) | B/A | Control (A) | Silica-treated (B) | B/A | Control (A) | Silica-treated (B) | B/A |
| BAL-subfractions | | | | | | | | | |
| alv 1 | 43.9±11.6 | 1163.3±591.7** | 26.50 | 7.4±5.6 | 48.8±16.5** | 6.59 | 0.14±0.08 | 4.49± 2.69** | 32.07 |
| alv 2 | 25.5±15.8 | 136.5± 24.8* | 5.35 | 8.1±3.4 | 14.9± 4.9 | 1.84 | 12.74±6.26 | 178.40±87.18** | 14.00 |
| LA | 58.0±11.8 | 1152.3± 91.5* | 19.90 | 19.1±5.4 | 62.6±37.6 | 3.28 | 2.40±1.11 | 9.59± 3.81** | 4.00 |
| SA | 3.1± 1.3 | 38.7± 9.7* | 12.48 | 3.9±1.1 | 4.4± 0.4 | 1.13 | 9.81±3.07 | 144.64±75.03** | 14.74 |
| Lamellar body subfractions | | | | | | | | | |
| lb A | 2.1± 0.1 | 14.7± 12.3 | 7.00 | 10.6±3.1 | 14.3± 0.6 | 1.35 | 0.01±0.01 | 0.20± 0.07* | 20.00 |
| lb B | 4.7± 1.4 | 203.9± 84.3** | 43.38 | 15.3±6.5 | 148.0±62.9** | 9.67 | 0.04±0.01 | 1.85± 1.49** | 46.25 |

Values are means ± S.D. for different preparations (n=3)

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ when compared with the levels in controls

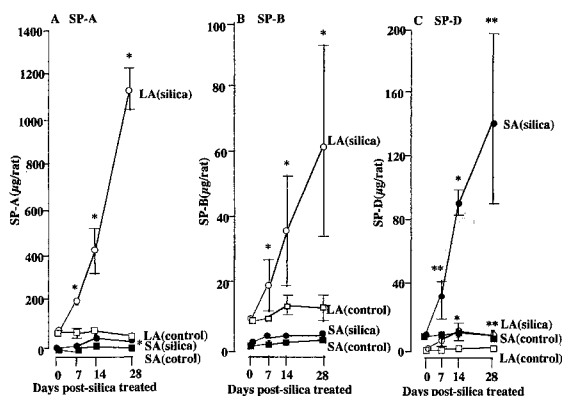


Fig. 3 Changes in SP-A (A), SP-B (B) and SP-D (C) contents in BAL-subfractions, i.e., large aggregates (LA) and small aggregates (SA) of rat lung after saline or silica treatment. Results are expressed as means \pm S.D. (μ g/rat) of 3 animal studies.

* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ when compared with the levels of control.

3.3 LB 亜画分の変化

LB 画分のリン脂質は、その亜画分 lbA と lbB に約 1:1 に分布するが、silica 投与後は、lbB 画分リン脂質が lbA 画分の約 10 倍であった。LB 画分の SP-A、SP-B 量も silica 投与後は同様に、lbB/lbA 比は約 10 倍以上であり、silica 投与によって lbB 画分 Sf 成分の著明な増量が認められた。

4 考 察

Dethloff *et al.*²⁾ は silica 粒子の気道内前処置 (200 mg/kg 体重) によって肺胞内 Sf 画分及び LB 画分リン脂質が、対照のそれぞれ 22 倍、123 倍に増加することを報告した。また Adachi *et al.*³⁾ はより少量の silica (40 mg/kg 体重) 投与による初期変化においても、同様に肺胞及び LB 内 Sf 画分リン脂質の増量と PG/PI 比の低下という質的变化がある事実を報告した。本研究では、40 mg/kg 体重 silica 気管内投与後、2 週以降に肺胞内に増量するリン脂質は、LA 型 Sf 及び SA 型 Sf でともに認められたが、28 日目では特に LA 型 Sf の増加が著明であることを示した。投与後 14 日目には、SA 型 Sf リン脂質の方が多くなると考えられた。これは、14 日目では分泌直後の LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換が促進されるが、28 日目では肺胞内 Sf の凝集傾向が強まるためと考えられる。silica 投与により LB 画分リン脂質の lbB/lbA 画分比は約 10 倍になり、小ラメラ封入体を含む lbB 画分の増量が顕著であった。これは、silica 投与ラットの肺胞 II 型細胞では、Sf リン脂質の

合成が活発で、ラメラ封入体へ蓄積されつつあることを示唆した。

silica 投与により、SP-A 及び SP-B もリン脂質と同じく、LA 型 Sf 及び lbB 型 LB で著明に増加した。silica 投与後の経時変化で SP-A の増加曲線の勾配に比し、SP-B 増加曲線のそれはやや緩やかであった。silica 投与後 28 日目では、alv 1 画分の SP-A 増加は約 26 倍に対し、SP-B は約 7 倍、LA 画分の SP-A 増加約 20 倍に対し、SP-B は約 3 倍であった。SP-A の増加に比し、SP-B の増加率は低く、さらに SA 画分の SP-B 値は silica 投与で変化はなかった。従ってこの結果から、LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換の間に SP-B の分解は進行するが、SP-A の分解は比較的少ないことが考えられる。肺胞内 SP-D の大部分は SA 型 Sf 画分に存在し、silica 投与によって約 14 倍に上昇した。LB 画分の存在量は極めて僅かであり、silica 投与刺激で肺胞 II 型細胞での SP-D 合成は亢進し、LB 以外の経路で細胞外へ分泌され、SA 型 Sf に存在すると思われる。

以上の結果は、silica 投与によって、肺胞 II 型細胞での Sf の合成及び分泌は亢進しており、Sf は LB 画分へ蓄積後、肺胞腔へ分泌され、肺胞腔に大量に蓄積することを示している。Adachi *et al.*³⁾ は silica 粒子による Sf リン脂質の肺胞内の蓄積が、Sf の肺胞からの除去機構の障害によることを示唆した。しかし、除去機構の障害と肺胞 II 型細胞での Sf 合成亢進とがあいまって、肺胞内に Sf が大量に蓄積すると思われる。ラットへの silica 粒子刺激により肺胞 II 型細胞の hyperplasia と hypertrophy が認められており¹⁸⁾、肺胞 II 型細胞の Sf 代謝に対する silica の影響が検討されている。Miller *et al.*^{19,20)} は、silica 処理ラット肺から IIA 細胞 (正常型)、IIB 細胞 (肥大型) の 2 種類の肺胞 II 型細胞を分離、IIB 細胞では choline kinase, CTP: phosphocholine cytidyltransferase 活性が上昇し、PC 合成が亢進していることを示した。さらに SP-AmRNA レベルは、silica 無処理ラットからの II 型細胞に比べ、IIA 細胞は 4.9 倍、IIB 細胞は 7.3 倍であった。Kawada *et al.*²¹⁾ は、silica 処理ラットの肺胞 II 型細胞を size で分画し、正常型と肥大型に分画、肥大型 II 型細胞では CTP: phosphocholine cytidyltransferase/mg DNA 活性の上昇があること、SP-A 含量は蛋白質当り 70%、DNA 当り 230% の増加が認められることを報告した。Suwabe *et al.*²²⁾ は、この肥大型 II 型細胞では細胞表面積が大きくなり、SP-A 受容体数の増加があるが、SP-A 結合の親和性に変化はなかったと報告している。すなわち、肺胞 II 型細胞は silica 投与刺

激で細胞数を増し、各細胞は肥大化する。この肥大化細胞ではSfリン脂質及び蛋白質の合成が著しく亢進している。しかし、その細胞形質膜におけるSP-A受容体への親和性は変わらないので、SP-A受容体を介するSfリン脂質代謝動態の調節に変化はないと考えられる。ただし、silica投与ラットSP-Aが、正常SP-Aの構造と機能を維持しているかどうかは現在不明である。

silica投与ラットにより肺胞内SP-B、SP-Dは増量するので、SP-B、SP-Dの分離に用いられるが、経時変化等の詳細な検討はない。本研究ではSA画分におけるSP-Dの著しい増加を認めたが、これはSP-Aと同じく肺胞II型細胞での合成亢進によると思われる。一方、silica処理ラットの肺胞腔内ではSP-Bの分解が進行していることが示唆された。NMU投与による急性肺傷害²³⁻²⁵⁾では、SP-Bの分解が進行し、SP-B量の回復がないことが主たる病因を形成するが、silicaによる慢性肺傷害においても、SP-Bの分解は進行していると思われる。silica処理ラット肺胞腔に蓄積するSP-Bと正常SP-Bとの構造上、機能上の差異についての報告はない。しかし、Voss *et al.*²⁶⁾は、PAP患者SP-Bは正常のものより分子量が大きいことを報告している。また、鈴木ら²⁷⁾は、SP-A、SP-B、Ca²⁺、リン脂質による再構成管状ミエリン形成能の検討で、正常SP-A、SP-Bを用いた場合に比べ、PAP患者SP-Bを用いた場合は、直角に交ったリン脂質膜が作る規則正しい格子断面を示す管状ミエリンは形成され難く、大小様々な不規則な構造がみられたと報告している。すなわち、PAP患者SP-Bは格子様構造形成に関してなんらかの機能異常が存在すると思われる。silica投与ラットのSP-Bは、電気泳動上、正常ラットSP-Bと同一であったが、その構造及び機能上の異常が存在する可能性はある。

前報⁵⁾のNMU投与急性肺傷害と本研究のsilica投与による慢性肺傷害は、その病態及びSfの影響は異なっているが、病態肺におけるSf変動の鍵がSf蛋白質の変動であることを共通に強く示唆している。今後は、Sf蛋白質の量的変動のみならず、質的变化について詳細に検討することが課題である。

5 結 論

BAL亜画分の総蛋白質、総リン脂質、Sf蛋白質SP-A、SP-B、SP-Dを指標として、silica投与により惹起されたラット慢性肺傷害における肺Sfの変動を検討し、以下の知見を得た。

1. silica投与後14日目には、LA型SfからSA型

Sfへの変換が促進されるが、28日目では肺胞内Sfリン脂質の凝集傾向が認められた。

2. silica投与ラットのSf亜画分のLA型Sf及び肺胞II型細胞のIbB型LBで、Sfリン脂質、SP-AとSP-Bが著明に増加し、Sfの合成、ラメラ封入体への蓄積、分泌が促進していると思われた。このモデルでは、以前に示唆された肺胞Sfの除去機構の障害に加えて、Sf合成、分泌の亢進があり、肺胞内にSfの大量蓄積がもたらされると考えられた。

3. silica投与後のBAL亜画分の経時変化で、SP-A、SP-B、SP-Dは各々異なった動態を示した。SP-A、SP-BはLA型Sf、SP-DはSA型Sfで著明に増加した、また、silica処理ラット慢性肺傷害において、SP-Bの分解が進行していると思われた。

謝 辞

本研究の御指導、御校閲をいただいた本学医学部生化学第1講座秋野豊明教授、本研究を遂行する機会をお与えいただきました本学医学部前内科学第3講座鈴木明教授、現内科学第3講座阿部庄作教授に深謝いたします。さらに御協力いただいた本学生化学第1講座の諸先生に感謝いたします。

文 献

1. Heppleston AG, Fletcher K, Wyatt I. Changes in the composition of lung lipids and the "Turn over" of dipalmitoyl lecithin in experimental alveolar lipo-proteinosis induced by inhaled quartz. *Br J Exp Pathol* 1974, 55: 384-395
2. Dethloff LA, Gilmore LB, Brody AR, Hook GER. Induction of intra-and extra-cellular phospholipids in the lungs of rats exposed to silica. *Biochem J* 1986, 233: 111-118
3. Adachi H, Hayashi H, Sato H, Dempo K, Akino T. Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica. *Biochem J* 1989, 262: 781-786
4. Honda Y, Kataoka K, Hayashi H, Takahashi H, Suzuki A, Akino T. Alterations of acidic phospholipids in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Clinica Chimica Acta* 1989, 181: 11-18
5. 渡辺智之, 黒木由夫, 菊池尚子. 病態肺におけるサーファクタントの変動に関する研究; 第1報N-nitroso-N-methylurethane投与により惹起される急性肺傷害—ARDS類似モデル—. 札幌医誌
6. 足立英明, 林秀紀. 気道内Silica投与ラットにおける

- 肺サーファクタントの変動に関する研究；第1報 サーファクタント・リン脂質代謝の変動. 札幌医誌. 1988, 57: 123-135
7. 足立英明, 平田公一. 気道内 Silica 投与ラットにおける肺サーファクタントの変動に関する研究；第2報 サーファクタント・アポ蛋白 (SP 36) の変動. 札幌医誌. 1988, 57: 163-172
 8. Nicholas TE, Power JHT, Barr HA. Effect of pattern of breathing on subfractions of surfactant in tissue and alveolar compartments of the adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 3: 251-258
 9. Jobe AH, Ikegami M, Seidner SR, Pettenazzo A, Ruffini L. Surfactant phosphatidylcholine metabolism and surfactant function in preterm, ventilated lambs. *Am Rev Respir Dis* 1989, 139: 352-359
 10. Duck-Chong CG. The isolation of lamellar bodies and their membranous content from rat lung, lamb tracheal fluid and human amniotic fluid. *Life Sci* 1978, 22: 2025-2030
 11. Shimizu H, Miyamura K, Kuroki Y. Appearance of surfactant proteins, SP-A and SP-B, in developing rat lung and the effects of in vivo dexamethasone treatment. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1081: 53-60
 12. Ogasawara Y, Kuroki Y, Shiratori M, Shimizu H, Miyamura K, Akino T. Ontogeny of surfactant apoprotein D, SP-D, in the rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1083: 252-256
 13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 265-275
 14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685
 15. Swank RT, Munkres KD. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 1971, 39: 462-477
 16. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959, 37: 911-917
 17. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959, 234(3): 466-468
 18. Panos RJ, Suwabe A, Leslie CC, Mason RJ. Hypertrophic alveolar type II cells from silica-treated rats are committed to DNA synthesis in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 3: 51-59
 19. Miller BE, Hook GER. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in activated alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989, 1: 127-136
 20. Miller BE, Bakewell WE, Katyal SL, Singh G, Hook GER. Induction of surfactant protein (SP-A) biosynthesis and SP-AmRNA in activated type II cells during acute silicosis in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 3: 217-226
 21. Kawada H, Horiuchi T, Shannon JM, Kuroki Y, Voelker DR, Mason RJ. Alveolar type II cells, surfactant protein A (SP-A), and the phospholipid components of surfactant in acute silicosis in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1989, 140: 460-470
 22. Suwabe A, Panos RJ, Voelker DR. Alveolar type II cells isolated after silica-induced lung injury in rats have increased surfactant protein A (SP-A) receptor activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, 4: 264-272
 23. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH. Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J Appl Physiol* 1990, 69(6): 2303-2310
 24. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH. Metabolism of exogenously administered surfactant in the acutely injured lungs of adult rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1992, 145: 19-23
 25. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993, 147: 218-233
 26. Voss T, Schäfer KP, Nielsen PF, Schäfer A, Maier C, Hannappel E, Maaßen J, Landis B, Klemm K, Przybylski M. Primary structure differences of human surfactant-associated proteins isolated from normal and proteinosis lung. *Biochim Biophys Acta* 1992, 1138: 261-267
 27. 鈴木康弘, 沈恵卿, 佐藤敦夫, 藤田葉子. 肺胞蛋白症患者肺洗浄液中の肺表面活性物質アポ蛋白の特徴. 日本界面医学誌 1993, 24: 93-98

別刷請求先

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部生化学第1講座 渡辺智之